



TITLE:

セルピンにおけるループ挿入中間状態の解析：アミロイド形成抑制へのアプローチ

AUTHOR(S):

高橋, 延行

CITATION:

高橋, 延行. セルピンにおけるループ挿入中間状態の解析：アミロイド形成抑制へのアプローチ. 2006

ISSUE DATE:

2006-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85074>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

セルピンにおけるループ挿入中間状態の解析：

アミロイド形成抑制へのアプローチ

16580099

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

京都大学図書



1060667838

附属図書館

平成18年3月

研究代表者 高橋延行

京都大学大学院農学研究科助手

科研

2005

308

附图

はしがき

プリオン病（狂牛病、クロイツフェルト・ヤコブ病）や、アルツハイマー病は、生体の持つ正常タンパク質が高次構造変化を起こしてアミロイド沈着などの病態を呈することから、コンフォメーション病と呼ばれている。これらに共通する特徴としては、特定のタンパク質がコンフォメーション変化を起こし、別の分子との間に β シート構造を形成し、重合凝集体を形成して組織への沈着を起こすことがあげられる。これらの病態を治療、予防するには、このコンフォメーション変化の原因を明らかにすることが重要であるが、実際の病理変化は長期間にわたるものであり観察が難しいため、タンパク質科学的なアプローチが必要とされている。

血清中のセリンプロテアーゼインヒビター（セルピン）の遺伝的分子異常は、タンパク質重合体の組織沈着を引き起こすなど、典型的なコンフォメーション病の様相を呈し、アルツハイマー病における老人斑の形成にも関与が示唆されている。この重合体形成は、セルピンがインヒビター活性を示す時に分子内で起こる「ループ挿入」と言うコンフォメーション変化が、分子間で起こることが引き金になっていると考えられるので、このループ挿入の分子機構を解析することは、コンフォメーション病における分子重合を制御する戦略の開発に資するものである。

研究組織

研究代表者 : 高橋延行（京都大学大学院農学研究科）

交付決定額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	3,100	0	3,100
平成17年度	700	0	700
総計	3,800	0	3,800

研究発表

（1）学会誌等

N. Takahashi, M. Onda, K. Hayashi, M. Yamasaki, T. Mita, and M. Hirose: Thermostability of refolded ovalbumin and S-ovalbumin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**, 922-931 (2005).

N. Takahashi, K. Terakado, G. Nakamura, C. Soekmadji, T. Masuoka, M. Yamasaki, and M. Hirose: Dynamic mechanism for the serpin loop insertion as revealed by quantitative kinetics. *Journal of Molecular Biology* **348**, 409-418 (2005).

(2) 口頭発表

中村元一、高橋延行、寺角香菜子、Carolina Soekmadji、舩岡俊夫、廣瀬正明：オボアルブミン変異体を用いたセルピン構造転移機構の反応速度論的解析

第77回日本生化学会大会 平成16年10月

中村元一、高橋延行、寺角香菜子、Carolina Soekmadji、舩岡俊夫、廣瀬正明：オボアルブミン変異体を用いたセルピン構造転移機構の反応速度論的解析

第77回日本生化学会大会（ワークショップ） 平成16年10月

N. Takahashi, K. Terakado, G. Nakamura, C. Soekmadji, T. Masuoka, M. Yamasaki, M. Hirose:

Transition state for the serpin loop insertion as revealed by quantitative kinetics

The 4th International Symposium on Serpin Structure, Function and Biology, SERPINS 2005 平成17年6月

舩岡俊夫、中村元一、高橋延行、廣瀬正明、相原茂夫

オボアルブミン変異体におけるセルピンセルピンループ挿入の pH 依存性に対する荷電アミノ酸の役割

第78回日本生化学会大会 平成17年10月

舩岡俊夫、中村元一、高橋延行、廣瀬正明、相原茂夫

オボアルブミン変異体におけるセルピンセルピンループ挿入の pH 依存性に対する荷電アミノ酸の役割

第78回日本生化学会大会（ワークショップ） 平成17年10月

研究成果

血清中などに見出されるセリンプロテアーゼインヒビター（セルピン）において、組織への沈着や重篤な遺伝的分子異常の原因となるコンフォメーション変化；ループ挿入を制御抑制することを目的とし、その中間状態を解析する方法を開発した。

研究対象として、セルピン・スーパーファミリーに分類されるものの、阻害活性を持たない卵白タンパク質；オボアルブミンに着目し、そのループ挿入を検出する実験系を探索した。従来はベイト・リージョンを切断するターゲット・プロテアーゼの他にループ挿入に関与する部分で切断するプロテアーゼ；サチライシンを用いて、ループ挿入前後のコンフォメーションの違いを、サチライシン感受性の変化を指標に解析していたが、操作が煩雑で、定量誤差も大きいため、より簡便で高精度の実験法が必要であった。本研究の端緒において、ループ挿入に伴うコンフォメーション変化により、イオン交換クロマトグラフィーにおける溶出位置が変化することを見出し、これを指標にループ挿入を定量的に解析することが可能となった。

本法を用いて、ループ挿入型オボアルブミン変異体 R339T/A352R のループ挿入を解析したところ、サチライシンを用いた解析法に比べ、著しく誤差は小さく、得られた一次反応速度定数は、従来法と同等であった。更に R339T/A352R に付加的に部位特異的置換を加えた変異体について、pH、温度を変えてループ挿入速度を解析した。その結果、各変異体とも、pH 依存性を示し、その変曲点は pH4.6 付近であり、ループ挿入の過程に酸性アミノ酸残基の関与が示唆された。ループ挿入の速度は中性付近で遅く、酸性側で速いことから、オボアルブミン変異体におけるループ挿入の pH 依存性の原因を探求することにより、セルピンにおけるループ挿入の制御抑制が可能であることが示された。